HIV-1 p24 ELISA Kit: Overview

The HIV-1 p24 ELISA Kit is used to measure the amount of HIV-1 p24 antigen in samples, by means of the enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). HIV-1 p24 antigen measurement is included in the fourth-generation ELISA, in the human immunodeficiency virus (HIV) tests. This Kit is used in research, for quantification of the HIV-1 p24 antigen. Because a detection antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) is used, the process can be completed by carrying the reaction out once, in contrast with other ELISA kits, in which biotin-conjugated antibodies are used, although this depends upon the antibody type. With this Kit, there is cross-reactivity with HIV-2 p26, which corresponds to HIV-1 p24, reducing the sensitivity, yet quantification is still sometimes possible.

The HIV-1 p24 ELISA Kit is a sandwich, enzyme-linked, immunological detection kit involving the use of polystyrene micro-wells coated with anti-HIV-1 p24 antibody. In the first step, the p24 antigen standard and antibody treated with a surface-active agent are introduced to the wells. For measurement of samples not containing sodium nitride and EDTA, or citric acid, HRP-conjugated anti-HIV-1 p24 antibody is added as the capture antibody, followed by incubation for 1 hour. On the other hand, for measurement of antibodies containing sodium nitride and EDTA, or citric acid, just the antigen and antibody are added beforehand, followed by incubation for 1 hour, washing, and then addition of HRP-conjugated anti-HIV-1 p24 capture antibody, and incubation for another hour. If the sample contains p24 antigen, it is captured in the wells, and at the same time a sandwich is formed with HRP-conjugated p24 antibody. In order to exclude unbound HRP-conjugated antibody, the micro-wells are washed, and an enzyme-substrate chromogen solution is added. In the case of wells containing the antibody-p24-antibody HRP sandwich immunocomplex, the solution undergoes blue coloration, but if the reaction is stopped by addition of sulfuric acid the color of the solution changes from blue to yellow. The coloration intensity is correlated to the antigen content of the sample, and wells containing samples without HIV-1 p24 remain colorless.

General precautions

1. This product is a reagent for use in research, and should not be used for other purposes.
2. This product should be used in accordance with the methods stipulated in the Package Insert.
3. This product should be used after carefully reading the leaflets, and the explanatory documents about handling, relating to the equipment used.

Details of Kit composition

No.	Reagent	Properties	Specifica-tions	Principal components
1	Solid-phase microplate	Plate	96 wells	Anti-HIV-1 p24 murine mono-clonal antibody
2	HIV-1 p24 standard bulk solution (2000pg/mL)	Liquid	1 mL × 1	Recombinant HIV-1 p24 Antigen
3	HRP-conjugated antibody (×100)	Liquid	0.1 mL×1	HRP-conjugated HIV-1 p24 antibody
4	Antigen/antibody (Ag/Ab) dilution buffer	Liquid	100mL×1	Phosphate buffer
5	Concentrated wash buffer (×20)	Liquid	50 mL × 1	Phosphate buffer
6	Chromogen solution A	Liquid	8 mL × 1	Citrate buffer
7	Chromogen solution B	Liquid	8 mL × 1	Citrate buffer
8	Stop solution	Liquid	8 mL × 1	2 N sulfuric acid

Additional item included: Three sheets of adhesive film.

Materials and equipment required other than included in Kit

1. Purified water
2. Micro-pipette (25 to 1000 μL)
3. Measuring cylinder (25 to 1000 mL)
4. Microplate-washer
5. Microplate-reader (single wavelength of 450 nm; or two wavelengths, with main wavelength of 450 nm, and reference wavelength of 650 nm).
6. Paper towels
7. Disposable gloves
8. Agents and/or devices for treatment of liquid waste

Precautions relating to operations

Samples for measurement include cell culture supernatants, cell lysates, serum, and plasma.

1. When measurements are carried out with samples containing sodium nitride and EDTA, or citric acid, the reactions should be carried out by the two-step method (Measurement Method 2).
2. Care should be taken to not allow microbial contamination of serum and plasma samples.
3. There is the potential for incorrect results with chyle-containing plasma samples, samples from jaundice patients, and hemolytic samples, so the Kit should not be used with these.
4. Measurements can be carried out even if samples have been inactivated.
5. Samples should be stored at 2 to 8ºC. Samples with which tests are not needed within 3 days should be stored frozen at –20ºC or lower.
6. Reagents and samples should not be repeatedly frozen and thawed.

Precautions relating to washing

1. A high-quality ELISA microplate-washing device is recommended, so that a high level of washing performance can be maintained. In general, in order to avoid false-positive reactions and high background levels, automated washing is recommended, with at least five cycles, each at 350 to 400 μL/well.
2. If washing is carried out manually, it should involve five cycles, with 350 to 400 μL/well of wash buffer being added in each cycle, following by removal by aspiration. If the results are poor, with high background levels, for example, either the number of washing cycles or the time for which the wash buffer is left in the well in each cycle should be increased.

Safety and precautions

1. The reagents should not be mixed between kits of different manufacturer's lots. At the time of the test, the reagents in this Kit should be prepared carefully, so that the optimal test results can be obtained.
2. Reagents should not be used when the use expiry date has passed.
3. Reagents and samples should be returned to room temperature (18 to 30ºC) before use.
4. After washing, care should be taken to not allow the microplates to dry.
5. Any samples collected from humans have the potential to be infective, and the appropriate precautions should therefore be taken.
6. Pipette tips, and tubes that have been used for measurement should be treated appropriately, with respect to wastewater, etc., and should then be disposed of.
7. If any of the stop solution is spilt, it should be wiped up immediately. If it comes into contact with the skin or eyes, these should be washed with water.
8. The enzymatic activities of HRP-conjugated compounds can be affected by materials such as dust, reactive drugs, sodium hypochlorite, acids, and alkalis, and measurements should therefore be carried out in places where these are not present.
9. The relevant Material Safety Data Sheets will be provided as requested.

Preparation

Preparation stage 1: Wash buffer is prepared by mixing the concentrate with distilled or de-ionized water in a 1:20 ratio.

Preparation stage 2: The required number of strips is placed in the strip-holder. Unused strips are returned to the pack.

Preparation stage 3: HRP-conjugated anti-HIV-1 p24 antibody is prepared. The amounts of HRP-conjugated antibody to be used are measured as portions into tubes, and then diluted to the dilution concentrations required by Measurement Method 1 or 2, using the Ag/Ab dilution buffer.

Measurement Method 1

This is used when samples not containing sodium azide and EDTA, or citric acid are measured.

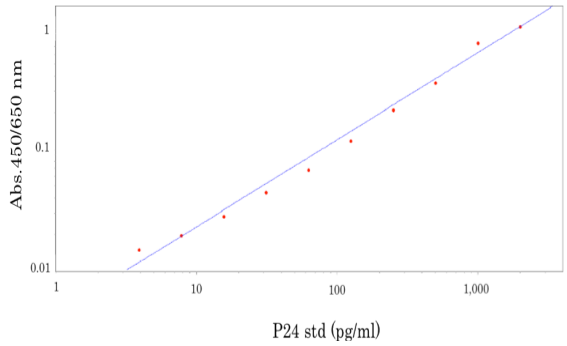
1. Standard HIV-1 p24 solution is diluted stepwise with Ag/Ab dilution buffer, and 50 µL is added to each well. The measurement sample is also added to each well, in 50-µL aliquots. For the blank, 50 µL of the Ag/Ab dilution buffer is added to a well.
2. HRP-conjugated antibody prepared by 100-fold dilution with Ag/Ab dilution buffer is added to each well in 50-µL aliquots.
3. The wells are covered with a plate-sealer, and allowed to react at room temperature for 60 minutes.
4. Each well is washed five times with diluted wash buffer. If the washing is manual, the micro-wells are filled for 30 to 60 s in each cycle, and after the final washing cycle the plate is inverted over highly absorbent tissue paper, and tapped lightly to remove remaining liquid.
5. To each well, including the blanks, 50 µL each of chromogen solutions A and B are added, and the plate is covered with a plate-sealer, and gently agitated, followed by incubation for 15 minutes at room temperature with protection from light.
6. To each well, 50 µL of stop solution is added, following by gentle agitation.
7. Optical absorbance is measured using a plate-reader, with the measurement wavelength being 450 nm, and the reference wavelength being 650 nm. The absorbance should be measured within 15 minutes after stopping the reaction.

Measurement Method 2

This is used when samples containing sodium azide and EDTA, or citric acid are measured.

1. Standard HIV-1 p24 solution is diluted stepwise with Ag/Ab dilution buffer, and 100 µL is added to each well. The measurement sample is also added to each well, in 100-µL aliquots. For the blank, 100 µL of the Ag/Ab dilution buffer is used.
2. The wells are covered with a plate-sealer, and allowed to react at room temperature for 60 minutes.
3. Each well is washed five times with diluted wash buffer. If the washing is manual, the micro-wells are filled for 30 to 60 s in each cycle, and after the final washing cycle the plate is inverted over highly absorbent tissue paper, and tapped lightly to remove remaining liquid.
4. HRP-conjugated antibody prepared by 200-fold dilution with Ag/Ab dilution buffer is added to each well in 100-µL aliquots.
5. The wells are covered with a plate-sealer, and allowed to react at room temperature for 60 minutes.
6. Each well is washed five times with diluted wash buffer. If the washing is manual, the micro-wells are filled for 30 to 60 s in each cycle, and after the final washing cycle the plate is inverted over highly absorbent tissue paper, and tapped lightly to remove remaining liquid.
7. To each well, including the blanks, 50 µL each of chromogen solutions A and B are added, and the plate is covered with a plate-sealer, and gently agitated, followed by incubation for 15 minutes at room temperature with protection from light.
8. To each well, 50 µL of stop solution is added, following by gentle agitation.
9. Optical absorbance is measured using a plate-reader, with the measurement wavelength being 450 nm, and the reference wavelength being 650 nm. The absorbance should be measured within 15 minutes after stopping the reaction.

Calibration curve



Storage and stability

The kit is stored at 2 to 8ºC, without freezing.

Precautions relating to use

This kit is for research use, and should not be used for diagnoses, etc.

Manufacturing & Technical Support

RYUKYU IMMUNOLOGY CORPORATION

Tel.: 098-943-3740; fax: 098-943-3740

E-mail: info@rimco.jp

HIV-1 p24 ELISA キットの概要

HIV-1 p24 ELISA キットは、酵素結合免疫測定法(ELISA)を用いて、検体中の HIV-１p24 抗原を定量するものです。この方法は HIV 検査の第 4 世代 ELISA にも組み込まれています。このキットは、HIV-1 p24 抗原を定量するための研究用キットとして使用します。HRP を標識した検出抗体を使うため、検体の種類によりますが、ビオチン標識抗体を用いる他社の ELISA キットと比べ、反応は１回で済みます。また、このキットは、HIV-1 p24 に相当する HIV-2 の p26 にも交差反応することから、感度は低いながらその定量ができる場合があります。

HIV-1 p24 ELISA キットは「サンドイッチ」酵素免疫測定キットであり、抗 HIV-1 (p24)抗体でコートされたポリスチレン・マイクロウェルを使用しています。最初のステップとして、p24 抗原スタンダードと界面活性剤処理した検体をウェルに注入します。チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を**含まない**検体の測定では、ペルオキシダーゼ(HRP)標識された捕獲用の抗 HIV-1p24 抗体を加え１時間インキュベーションします。一方、チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を**含む**検体の測定では、予め抗原や検体のみを加えて１時間インキュベーションし、洗浄後に、ペルオキシダーゼ(HRP)標識された捕獲用の抗 HIV-1p24 抗体を加え１時間インキュベーションします。検体に p24 抗原が存在する場合、ウェルの中に捕獲され、同時に HRP 標識 p24 抗体でサンドイッチされます。未結合の HRP 標識抗体を除去するためマイクロウェルを洗浄し、その後、酵素基質発色液をウェルに加えます。Ab-p24-Ab(HRP)のサンドイッチ免疫複合体を含むウェルでは、無色から青色の溶液に変化します。硫酸を加えて反応を停止すると、溶液の色が青色から黄色になります。色の濃さは検体中の抗原の量と相関します。HIV-1 p24 が陰性の検体を入れたウェルは無色のままです。

▶ 全般的な注意

1. 本品は研究用試薬ですので、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 添付文書に記載の使用方法に従ってください。
3. 使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用してください。

▶ キット構成内容

No.	試 薬	性 状	規 格	主 要 成 分
1	固相ﾏｲｸﾛﾌﾟﾚｰﾄ	ﾌﾟﾚｰﾄ	96 ｳｪﾙ	抗 HIV-1 p24 ﾏｳｽﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体
2	HIV-1 p24 標準原液（2000pg/ml）	液 状	1mlx1	ﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄ HIV-1 p24 抗原
3	HRP 標識抗体（×100）	液 状	0.1mlx1	HRP 標識抗 HIV-1 p24 抗体
4	抗原抗体希釈液	液 状	100mlx1	ﾘﾝ酸緩衝液
5	洗浄液（×20）	液 状	50mlx1	ﾘﾝ酸緩衝液
6	発色液 A	液 状	8mlx1	クエン酸緩衝液
7	発色液 B	液 状	8mlx1	クエン酸緩衝液
8	反応停止液	液 状	8mlx1	2N 硫酸

付属品：粘着フィルム　3 枚

▶ キット構成品以外に必要な材料・器具

1. 精製水
2. マイクロピペット（25～1000µl）
3. メスシリンダー（25～1000ml）
4. マイクロプレートウォッシャー
5. マイクロプレートリーダー（単 1 波長：450nm または 2 波長：主波長 450nm、参照波長 650nm）
6. ペーパータオル
7. 使い捨て手袋
8. 廃液処理液／廃液処理容器

▶ 操作上の注意

測定検体について

検体は、細胞培養上清、細胞可溶化物、血清や血漿です。

１)チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含む検体を測定する場合は、２ステップ方法で反応を行ってください。
（測定方法２参照）

２)血清や血漿検体は微生物に汚染されないように注意してください。

３）乳糜血漿や、黄疸、溶血したサンプルなどは誤った検査結果が出る可能性がありますので、使用しないでください。

４）検体は非働化しても測定できます。

５）検体は 2－8℃で保管してください。3 日以上検査する必要がない検体は凍結保存（－20℃以下）してください。

6）試薬やサンプルを繰り返し凍結・解凍をする事はさけてください。

▶ 洗浄の注意

1. 高いレベルの洗浄能力を保った高品質な ELISA 用マイクロプレート洗浄機を推奨します。一般的に偽陽性反応と高いバックグラウンドを防ぐため、350－400μl/ウェルの5回以上の自動洗浄サイクルを推奨します。
2. 手動洗浄する場合 5 サイクル、350－400μl/ウェルを注入し溶液の吸引という操作を 5 回繰り返す事を薦めます。結果が思わしくない場合（高いバックグラウンド）には、各ウェルの洗浄サイクルか漬込み時間を増やしてください。

▶ 安全性と注意事項

1. 試薬は別ロットのキットと混ぜないでください。本キットの試薬は検査時、最適な検査結果がでるように厳密に調整されています。
2. 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
3. 使用前、試薬とサンプルは室温（18－30℃）に戻してください。
4. 洗浄後、マイクロプレートを乾燥させないよう注意してください.
5. 人から採取した検体は全てに感染性のある可能性がありますので注意してください。
6. 測定に使用したチップやチューブ、廃液などは適切な処理をしてから廃棄してください。
7. 反応停止液をこぼした場合はただちに拭き、肌や目に触れた場合は水で洗浄してください。
8. HRP 標識化合物の酵素活性は、塵、反応薬剤や次亜塩素酸ナトリウム、酸、アルカリ等の影響を受ける可能性がありますので、これらの影響が無い場所で測定を行ってください。
9. 成分安全データ資料は問い合わせにより提供します。

▶準備

準備その１：洗浄バッファーを 1：20 の割合で蒸留水又は脱イオン水で調製します。

準備その２：必要な数のストリップをストリップ・ホルダーにセットしてください。使わないストリップは、元のバックに返して下さい。

準備その３：HRP 標識抗 HIV-1 p24 抗体の調製

HRP 標識抗体は使用する分量を別のチューブに測り、測定方法 1 または 2 に従った希釈濃度に抗原抗体希釈液で希釈してください。

▶ 測定方法１：チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含まない検体を測定するとき

(1) HIV-1 p24 標準溶液を抗原抗体希釈溶液で段階希釈し、各ウェルに 50μl ずつ加えます。測定サンプルも 50μl ずつ各ウェルに加えます。ブランクには抗原抗体希釈溶液を 50μl 加えます。

(2) 抗原抗体希釈液で 100 倍希釈に調製した HRP 標識抗体を 50μl ずつ各ウェルに添加します。

(3) プレートシールで覆い、室温で 60 分間、反応させます。

(4) 各ウェルを **5 回**、希釈洗浄バッファーで洗浄します。（手動洗浄する場合、毎回 30－60 秒程マイクロウエルを浸しておきます。最終洗浄サイクルの後、吸収性の高いティッシュの上にプレートを逆さにし、軽くたたいて残りの液体を取り除きます。）

(5) ブランクを含めた各ウェルに 50μl の発色液 A と 50μl の発色液 B を添加し、プレートシールでプレートを覆い、軽くプレートをたたき攪拌させてください。**遮光し、室温で 15 分間**インキュベートします。

(6)各ウェルに反応停止液を 50μl ずつ加え、軽く攪拌させてください。

(7) プレートリーダーで吸収度を測定します。

・測定波長 450nm

・参照波長 650nm

（**注**：反応停止後は、15 分以内に吸光度を測定してください。）

▶ 測定方法２：チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含む検体を測定するとき

(1) HIV-1 p24 標準溶液を抗原抗体希釈溶液で段階希釈し、各ウェルに 100μl ずつ加えます。測定サンプルも 100μl ずつ各ウェルに加えます。ブランクには抗原抗体希釈溶液を 100μl 加えます。

(2) プレートシールで覆い、室温で 60 分間、反応させます。

(3) 各ウェルを **5 回**、希釈洗浄バッファーで洗浄します。（手動洗浄する場合、毎回 30－60 秒程マイクロウエルを浸しておきます。最終洗浄サイクルの後、吸収性の高いティッシュの上にプレートを逆さにし、軽くたたいて残りの液体を取り除きます。）

(4) 抗原抗体希釈液で 200 倍希釈に調製した HRP 標識抗体を 100μl ずつ各ウェルに添加します。

(5) プレートシールで覆い、室温で 60 分間、反応させます。

(6) 各ウェルを **5 回**、希釈洗浄バッファーで洗浄します。（手動洗浄する場合、毎回 30－60 秒程マイクロウェルを

浸しておきます。最終洗浄サイクルの後、吸収性の高いティッシュの上にプレートを逆さにし、軽くたたいて残りの液体を取り除きます。）

(7) ブランクを含めた各ウェルに 50µl の発色液 A と 50µl の発色液 B を添加し、プレートシールでプレートを覆い、軽くプレートをたたき攪拌させてください。**遮光し、室温で 15 分間**インキュベートします。

(8)各ウェルに反応停止液を 50μl ずつ加え、軽く攪拌させてください。

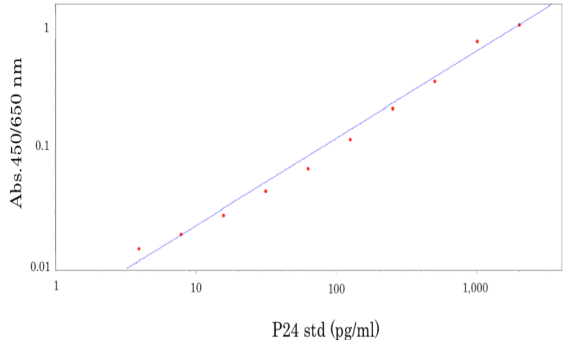
(9) プレートリーダーで吸収度を測定します。

・測定波長 450nm

・参照波長 650nm

（**注**：反応停止後は、15 分以内に吸光度を測定してください。）

▶ 検量線



▶ 保存と安定性

キットは凍結せずに 2－8℃で保管してください。

▶ 使用上の注意

本キットは**研究用**です。診断等には使用できません。

▶ 技術サポート

株式会社琉球免疫研究所

TEL: 098-943-3740, FAX: 098-943-3740

E-mail: info@rimco.jp